トリアムシノロン医薬品分析における ZORBAX Rapid Resolution HT カラムの選択法とスケーラビリティ

アプリケーション

製薬

著者

John W. Henderson and Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

非常に規格化された製造法で製造される ZORBAX RRHT StableBond C18 カラムは、カラムサイズや粒径に関係なく、同じ選択性の分離が得られます。

トリアムシノロンの USP 分析法の改良を、カラムの変更によってのみ行いました。十分な分離能を維持しながら、分析時間が 1/5 になり感度が 2 倍になりました。

はじめに

HPLC 分析をスピードアップしてラボの生産性を高めたいが、確立された頑健なメソッドを変更することには抵抗があるといった相反する状況は、信頼性の高い HPLC コンポーネントを初めから使用することで軽減されるか、実際にはなくすことができます。

例えば、米国薬局方（USP）のメソッドで指定されるカラムの多くは、サイズが 4.6 × 250mm で、5µm の C18（L1）粒子が充填されています。こうしたカラムでの分析時間は、一般的に 30 分にも及びます。しかし、新しいカラム技術により粒径が小さい充てん剤を短いカラムに充てんすることで、クロマトグラムの分離能を犠牲にすることなく、分析時間を著しく削減することができます。このアプリケーションノートでは、トリアムシノロンに関する USP のメソッドの改良が、カラム長さを短くし粒径を小さくすることによって、簡単かつ確実に行えることを示します。

トリアムシノロンは抗炎症ステロイドの一種で、投与方法によって様々な種類の疾患治療に使用されます。経口投与の場合では、その免疫抑制効果により、リウマチ疾患、アレルギー、狼瘡、その他免疫系の疾患に対して有効です。吸入投与は、慢性喘息の治療に使用されます。また、接触性皮膚炎、湿疹、乾癬、さらには虫刺されなどさまざまな皮膚症状を治療するために局所的に塗布することもできます。長時間のコルチコステロイド効果を得るために注射投与することもできます。

トリアムシノロンに関する標準的な USP メソッドは、3.9 mm × 300 mm の C18 カラム（L1）と 254 nm での UV 検出を使用する HPLC メソッドです [1]。移動相は水／メタノール（40/60）で、流量は 1.5 mL/min です。このメソッドでは、トリアムシノロンが最初に溶出し、次に内部標準であるヒドロコルチゾンが溶出します。

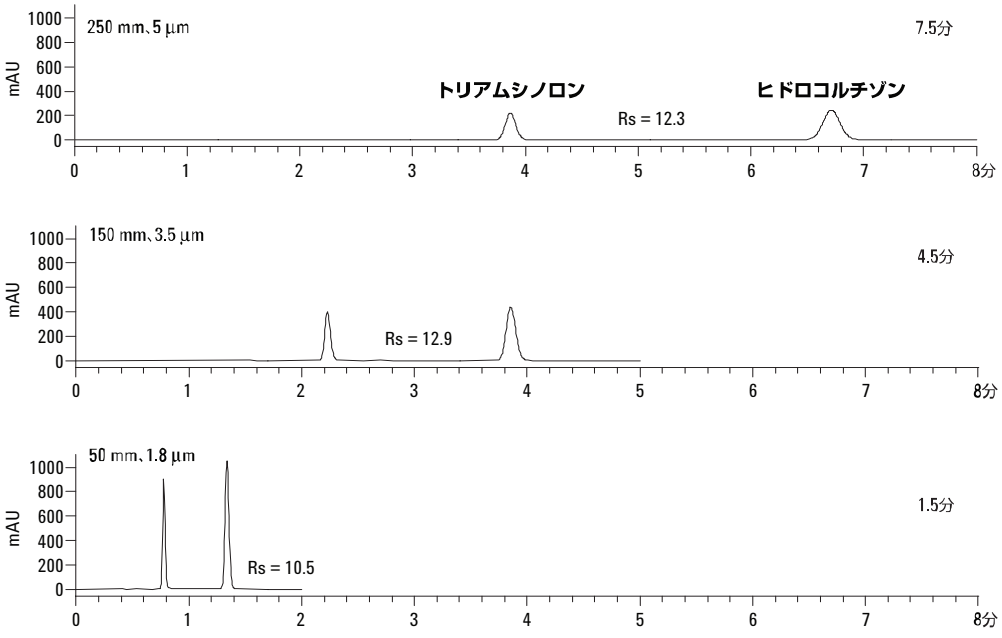
カラム長さと粒径のスケーラビリティ

スケーラビリティとは、オリジナルの HPLC メソッドの分離性能を維持しながら、カラム内径やカラム長さ、および充てん剤粒径を変更できるメソッドの機能のことを指します。ZORBAX StableBond C18 カラムのスケーラビリティについて、3 通りのカラム長さと粒径の組み合わせでテストを行いました。図 1 は、USP メソッドに基づくトリアムシノロンの分析例です。

1 番上のクロマトグラムは、標準的な寸法である 4.6 mm（内径）× 250 mm（長さ）のカラムによるオリジナルメソッドによるものです。2 番目と 3 番目のクロマトグラムでは、カラム長さと粒径が小さくなっています。カラム長さが短くなることの利点は、十分な分離能を維持しながら分析速度と感度が増大することです。USP では、トリアムシノロンと内部標準ヒドロコルチゾンとの分離係数を 3.0 以上に指定しています。ZORBAX StableBond (SB) C18 を使用すると、USP メソッドで必要とされる分離能の 3 ～ 4 倍の分離能が得られます。さらに重要なことは、カラム長さを最も短くして（50 mm）粒径を小さくした（1.8 µm）場合に、分析時間を 1/5 に削減することができることです。さらに、感度が 2 倍以上向上します。こうした改善は、カラムを交換するだけで可能になります。

粒径が選択性に及ぼす影響

カラム寸法と充てん剤粒径を変更することで生産性を向上できるのは、球状のシリカ粒子と結合相そのものに再現性があるためです。ZORBAX ベースシリカの製造プロセス、化学結合相導入プロセス、および標準化されたカラムテストを高度に規格化化することで、ユーザは最終的に分離能に影響する選択性の変化を受けることなく、カラムを自由に交換できます。この均一性を測定する方法の 1 つとして、さまざまな粒径で選択性係数を比較します。選択性とは、リテンション係数の比です。図 2 に、トリアムシノロンを同じサイズ（4.6 × 50 mm）で粒径



カラム:	ZORBAX SB-C18 (4.6 mm内径X以下の長さ) 上クロマトグラム: 長さ250 mm、粒径5 µm、カラムp/n 880975-902 中クロマトグラム: 長さ150 mm、粒径3.5 µm、カラムp/n 863953-902 下クロマトグラム: 長さ50 mm、粒径1.8 µm、カラムp/n 822975-902
移動相:	A = 水 B = MeOH
アイソクラティック組成:	40% A/60% B (容積比)
流量:	1.5 mL/min
注入量:	10 µL
検出器:	UV (254 nm)
フローセル:	セミミクロフローセル(4.5 µL、p/n G1315-60011)

図 1. カラム（カラム長さ、充てん剤）を変更することで、十分な分離能を維持しながら分析速度と感度が増大します。

の異なる（5 µm、3.5 µm、1.8 µm）SB-C18 のカラムで分析した例を示します（分析時間は 1.5 分）。この 3 種類のカラムでは、保持比(k)が 1.5% 以内で再現しました。また、選択係数(α)が一致したことにより、粒径の異なる化学結合型充てん剤は化学的に非常に類似していることが示されました。

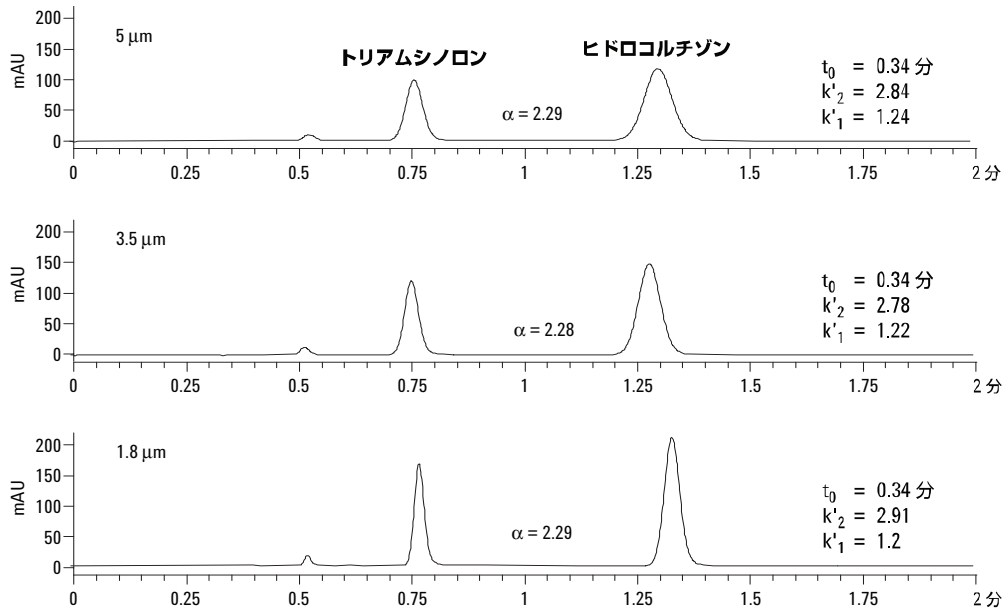
カラム内径のスケーラビリティ

分離のスケーラビリティは、図 1 と図 2 で示すように、カラム長さおよび粒径とは無関係でした。さらに、カラムの内径(id)の関数として、スケーラビリティをテストしました。図 3 に示す 3 つのクロマトグラムは、同じカラム長さで内径を変更した場合のトリアムシノロンを分離例です。

流量は (1)式に基づいて同じ線流速が得られるように調整しました。

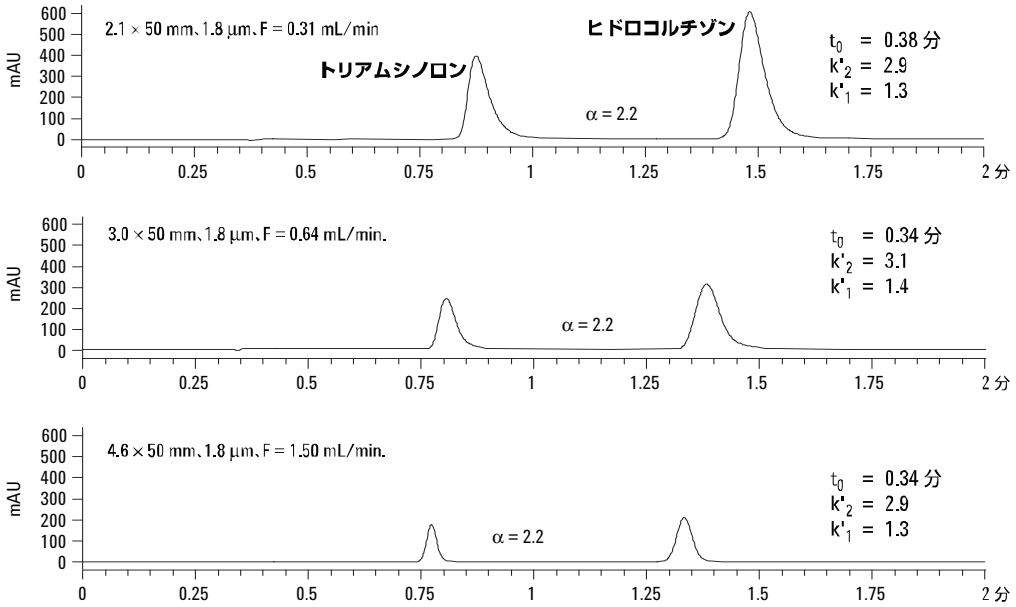
$$F_2 = F_1 (id_2/id_1)^2 \qquad (1)$$

ここで、F_2 と F_1 はそれぞれ新しい流量と元の流量で、id_2 と id_1 はそれぞれ新しいカラム内径と元のカラム内径です。充てん剤の選択性の同一性は、メソッドの単純な変換を可能にします。カラムの内径が減少しても、分離能は維持され感度は向上します。感度の向上については、極めて少ないサンプル量で最大の感度を必要とする場合のような、サンプル量が限られている状況において重要です。ピーク高さは、カラム内径の 2 乗の逆数に反比例することに注意してください。さらなる利点として、分離能と速度が犠牲になることなく溶媒の使用が同じ割合で減少します。



カラム:	ZORBAX SB-C18 (4.6 × 50 mm) 上クロマトグラム: 5 µm、カラムp/n 846975-902 中クロマトグラム: 3.5 µm、カラムp/n 835975-902 下クロマトグラム: 1.8 µm、カラムp/n 822975-902
移動相:	A = 水 B = MeOH
アイソクラティック組成:	40% A/60% B (容積比)
流量:	1.5 mL/min
注入量:	10 µL
検出器:	254 nm
フローセル:	セミミクロフローセル(4.5 µL、p/n G1315-60011)

図 2. スケーラビリティ:粒径の変化とカラムの選択性(α)。カラム:4.6 × 50 mm



カラム:	ZORBAX SB-C18 (1.8 µm、4.6 × 50 mm)
	上クロマトグラム: 0.31 mL/min、カラムp/n 822700-902
	中クロマトグラム: 0.64 mL/min、カラムp/n 8229575-302
	下クロマトグラム: 1.50 mL/min、カラムp/n 827975-902
移動相:	A = 水
	B = MeOH
アイソクラティック組成:	40% A/60% B (容積比)
流量:	クロマトグラムを参照
注入量:	10 µL
検出器:	254 nm
フローセル:	セミミクロフローセル(4.5 µL、p/n G1315-60011)

図 **3.** スケーラビリティ:カラム内径を変更することで、分離能を維持しながら感度が向上します。

結論

ラボの生産性を向上させるために開発された新しい HPLC カラム技術は、確立された頑健なメソッドに簡単に適用できます。ZORBAX RRHT StableBond C18 カラムの高度に規格化された製造法は、カラムサイズや充てん剤粒径に関係なく、同じ選択性の分離を提供します。トリアムシノロンにおける USP メソッドを改良することができました。カラムの変更を行うだけで、分析時間が 1/5 に短縮されて選択性が 2 倍に増える一方、十分な分離能が維持されました。

参照文献

1. *United States Pharmacopeia*, USP27-NF22, page 1875

詳細について

製品とサービスの詳細については、弊社ウェブ・サイトをご覧ください (www.agilent.com/chem)

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
April 11, 2006
5989-4878JAJP

Agilent Technologies